

令和元年6月18日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2015～2018

課題番号：15KT0071

研究課題名(和文) 遷移状態を制御する機能性人工生体分子の開発

研究課題名(英文) Development of functional artificial biomolecules to control transition state

研究代表者

川上 隆史 (KAWAKAMI, Takashi)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：60638881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：数兆種類という多様(diverse)な(ポリ)ペプチドタグライブラリーからの超高速スクリーニングを可能にする無細胞系の分子進化により、タンパク質ラベリング用ポリペプチドタグを創製する新システム(DIVERSEシステム: Directed In Vitro Evolution of Reactive peptide-tags via Sequential Enrichment)を開発し、非酵素的に共有結合でラベリングするペプチドタグのde novo創製を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、ポリペプチドタグと低分子の反応などの生体分子関連化学反応を始めとする様々な化学反応の創製や遷移状態制御の機構解明という学術的意義を有している。また、疾患原因タンパク質(疾患原因遺伝子)の機能を阻害することに発展応用していくことも可能であり、疾病の治療を始めとする医療応用を通して人類の福祉・健康に貢献していくという社会的意義も有している。

研究成果の概要(英文)：We successfully developed a novel system (DIVERSE system, Directed In Vitro Evolution of Reactive peptide-tags via Sequential Enrichment) to create polypeptide tags for protein labeling achieved by cell-free evolution-based ultra high-throughput screening of highly diverse (> 10<sup>10</sup>) polypeptide tag libraries.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：遷移状態 PUREシステム cDNAディスプレイ in vitro virus mRNAディスプレイ 生体直交性反応 C  
u-free click chemistry DIVERSEシステム

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(ポリ) ペプチドタグと低分子の反応などの生体分子関連化学反応の創製は、化学反応の遷移状態制御の機構解明において非常に重要である。これまでに、低分子との反応を介して特定タンパク質をラベルするための様々な(ポリ) ペプチドタグ(ソルターゼ基質ペプチドタグ、トランスグルタミナーゼ基質ペプチドタグ等)が報告されているが、天然に既に存在するタンパク質の改変や、低分子間の相互作用メカニズムに基づいたデザイン、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ等の生細胞系分子進化のいずれかによって開発されてきている(Tsukiji and Nagamune, ChemBioChem 2009)。

また、ポリペプチドと低分子との間の化学反応などの種々の生体分子に関連する化学反応の開発は、化学反応において遷移状態を制御するメカニズムの解明に対して、非常に重要な構造的アプローチである。過去に、ポリペプチドと低分子とを化学反応させるための、抗体(免疫グロブリン分子)を始めとする種々の機能性タンパク質が開発されてきているが、その分子量の巨大さから、分子レベルでの自在な人工改変は難しいと言う欠点が存在する。

これまでに研究代表者は、人工改変した再構築型無細胞翻訳系(PURE システム)を用いることによって、ペプチド骨格を始めとするNアルキルペプチド骨格(Kawakami et al., J. Am. Chem. Soc. 2013)や非天然型環状骨格(Kawakami et al., Chem. Sci. 2013)を翻訳ペプチド化合物ライブラリーに構築することに成功してきた。そして、分子進化工学的スクリーニング法の一つである mRNA ディスプレイ法(*in vitro virus* 法)と組み合わせて、数兆種類の大規模ライブラリーからのセレクション(スクリーニング)を行うことにより、抗体に匹敵する結合力と特異性で、標的タンパク質に結合する環状Nアルキルペプチド化合物を発見し、創薬研究へと応用してきた(Kawakami et al., ACS Chem. Biol. 2013)。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、上記スクリーニングシステムに、20000種類を超える全ヒト cDNA クローンのライブラリーを用いた大規模ヒトタンパク質発現技術(HUPEX)を組み合わせることによって、ヒトタンパク質を標的とする環状Nアルキルペプチド化合物の、より高速な同定システムを確立している。また、本システムにヒト腕型ロボット技術を組み合わせることにより標的タンパク質に結合する環状Nアルキルペプチド化合物群の創製を完全自動化し、プロテオミクスによる解析に応用することにも成功している。更に、クリーンルーム内設置型の超高感度質量分析システム DNLC-MS/MS を用いたプロテオミクスアプローチにより、同定した環状Nアルキルペプチド化合物のタンパク質・タンパク質間相互作用の阻害部位の同定(分子プロファイリング)を可能にする技術の開発を行なっている。

そこで本研究では、タンパク質ラベリング用ポリペプチドタグを創製する新システム(DIVERSE システム: Directed *In Vitro* Evolution of Reactive peptide-tags via Sequential Enrichment)を開発し、非酵素的に共有結合でラベリングするペプチドタグの *de novo* 創製を達成する。そして創製したペプチドタグを用いて、様々な蛍光プローブによるタンパク質ラベリングや生細胞内タンパク質のバイオイメーキングへの応用を実証する。また、Cu-free click chemistry を始めとする生体直交性化学反応(bio-orthogonal reaction)を利用して、遷移状態を制御するための新たな人工分子の調製を推進する。

## 3. 研究の方法

数兆種類という多様(diverse)な(ポリ)ペプチドタグライブラリーからの超高速スクリーニングを可能にする無細胞系の分子進化により、タンパク質ラベリング用ポリペプチドタグを創製する DIVERSE システムを開発し、非酵素的に共有結合でラベリングするペプチドタグの *de novo* 創製を達成する。そして、蛍光ゲル撮影装置や蛍光顕微鏡観察を用いて、創製したペプチドタグを介した、様々な蛍光プローブによるタンパク質ラベリングや生細胞内タンパク質のバイオイメーキングへの応用を実証する。

また、Boc2O を用いて出発物質の Boc 保護、酸塩化物を経由してエステル化へと活性化、酸による脱 Boc 化を行う。最後に生体直交性化学反応による目的化合物の同定は、NMR により行う。

## 4. 研究成果

数兆種類という多様(diverse)な(ポリ)ペプチドタグライブラリーからの超高速スクリーニングを可能にする無細胞系の分子進化により、タンパク質ラベリング用ポリペプチドタグを創製する DIVERSE システムを開発し、非酵素的に共有結合でラベリングするペプチドタグの *de novo* 創製を達成した。そして創製したペプチドタグを用いて、様々な蛍光プローブによるタンパク質ラベリングや生細胞内タンパク質のバイオイメーキングへの応用を実証した。

DIVERSE システムは、新規ペプチドタグの *de novo* 創製に限らず、数十兆種類のポリペプチドタグライブラリーからの超高速スクリーニングを介した、既存ポリペプチドタグの配列最適化等への応用も期待することができる。

また、Cu-free click chemistry を始めとする生体直交性化学反応(bio-orthogonal reaction)を利用して、遷移状態を制御するための新たな人工分子の調製を推進した結果、生体直交性官能基の修飾体に対する前駆体の生成を確認することに成功した。そして、遷移状態を制御する

ための新たな有機化合物の反応の確認に成功した。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

- ① Mizuki Yamamoto, Takehiro Ando, Rina Iwamoto, Keita Tsukamoto, [Takashi Kawakami](#), Development of Novel PCSK9-Binding Cyclic Peptides for Hyperlipidemia Treatment, *Peptide Science*, 査読有、55, 2018, 105
- ② Yu Shimizu, Masashi Sato, Yoshitsugu Onuki, [Takashi Kawakami](#), Hiroshi Kurosawa, Ultra-high-throughput Screening of Cyclic *N*-alkyl Peptides Useful for Maintaining Pluripotency and Growth of Induced Pluripotent Stem Cells, *Peptide Science*, 査読有、55, 2018, 106
- ③ Mizuki Yamamoto, Hiroki Suzuki, Tomohiro Iwabuchi, Yu Shimizu, [Takashi Kawakami](#), Peptide Selection against Reactive Small Molecular Probes for Protein Imaging and Opto-genetics by Using the DIVERSE Screening System, *Peptide Science*, 査読有、54, 2017, 200-201
- ④ [Takashi Kawakami](#), Koji Ogawa, Tomohisa Hatta, Naoki Goshima, and Tohru Natsume, Directed Evolution of a Cyclized Peptoid-Peptide Chimera against a Cell-Free Expressed Protein and Proteomic Profiling of the Interacting Proteins to Create a Protein-Protein Interaction Inhibitor, *ACS Chemical Biology*, 査読有、11, 2016, 1560-1577  
DOI: 10.1021/acscchembio.5b01014
- ⑤ Miya Kurata, Naoko Yanada, Koichiro Ikai, Daiki Sakamoto, [Takashi Kawakami](#), De Novo Creation of Non-enzymatically Covalent-labeling Peptide Tags for Protein Imaging by Using the DIVERSE System, *Peptide Science*, 53, 2016, 227-228
- ⑥ Naoko Yanada, Miya Kurata, Daiki Sakamoto, Koichiro Ikai, [Takashi Kawakami](#), Site-specific Labeling of Peptide-tagged Proteins with Nano-sized Fluorescent Probes in Living Cells for Single-molecule Imaging, *Peptide Science*, 査読有、53, 2016, 207-208
- ⑦ [Takashi Kawakami](#), Koji Ogawa, Naoki Goshima, and Tohru Natsume, De novo creation of peptide tags for non-enzymatic covalent labeling by *in vitro* evolution for protein imaging inside living cells, *Chemistry & Biology*, 査読有、22, 2015, 1671-1679  
DOI: 10.1016/j.chembiol.2015.10.016
- ⑧ [Takashi Kawakami](#), Shinya Ito, Naoki Goshima, Kazuhiro Nagata, and Tohru Natsume, Post-translational modification mapping of collagen that binds to HSP47 by directed ligand evolution and DNLC mass spectrometry, *Peptide Science*, 査読有、52, 2015, 321-322
- ⑨ [Takashi Kawakami](#), Kazuma Murakami, Daiki Sakamoto, Mizuho Hanaki, Tohru Natsume, and Kazuhiro Irie, *In vitro* display evolution of cyclized peptidomimetics targeted to a chemically synthesized amyloid beta protein dimer, *Peptide Science*, 査読有、52, 2015, 323-324

〔学会発表〕(計18件)

- ① Mizuki Yamamoto, Takehiro Ando, Rina Iwamoto, Keita Tsukamoto, [Takashi Kawakami](#), Development of Novel PCSK9-Binding Cyclic Peptides for Hyperlipidemia Treatment, 10th International Peptide Symposium, 2018
- ② Yu Shimizu, Masashi Sato, Yoshitsugu Onuki, [Takashi Kawakami](#), Hiroshi Kurosawa, Ultra-high-throughput Screening of Cyclic *N*-alkyl Peptides Useful for Maintaining Pluripotency and Growth of Induced Pluripotent Stem Cells, 10th International Peptide Symposium, 2018
- ③ [川上隆史](#)、ケミカルバイオロジーを基盤とする機能性ペプチドの創製、Kofu Stem Cell Conference, KSCC 2018 (招待講演)、2018年
- ④ 山本美月、鈴木宏輝、岩渕智宏、清水優、[川上隆史](#)、新規小分子結合ペプチドタグの開発とバイオイメージングへの応用、日本ケミカルバイオロジー学会第13回年会、2018年
- ⑤ 鈴木宏輝、山本美月、岩渕智宏、清水優、[川上隆史](#)、自己免疫疾患治療薬の開発を目指した新規 IL6/IL6R 間相互作用阻害剤の探索、日本ケミカルバイオロジー学会第13回年会、2018年
- ⑥ 岩渕智宏、山本美月、鈴木宏輝、清水優、[川上隆史](#)、薬剤の血中半減期増加への応用を目指した新規 Fc 結合ペプチドの開発、日本ケミカルバイオロジー学会第13回年会、2018年
- ⑦ 山本美月、鈴木宏輝、岩渕智宏、[川上隆史](#)、Peptide Selection against Reactive Small Molecular Probes for Protein Imaging and Opto-genetics by Using the DIVERSE Screening System, 日本ペプチド学会第54回ペプチド討論会、2017年
- ⑧ [川上隆史](#)、Chemistry から Biology への展開-DIVERSE スクリーニングシステムの開発とバ

- イオイメージングへの応用-、日本化学会第97春季年会（招待講演）、2017年
- ⑨ 川上隆史、DIVERSE システムを用いた蛋白質ラベリング用ペプチドタグ創製とバイオイメージングへの応用、第7回「産と学をつなぐ SENRI の会」（招待講演）、2017年
  - ⑩ 倉田みや、築田奈央子、猪飼航一郎、坂本大樹、川上隆史、De Novo Creation of Non-enzymatically Covalent-labeling Peptide Tags for Protein Imaging by Using the DIVERSE System、日本ペプチド学会第53回ペプチド討論会、2016年
  - ⑪ 築田奈央子、倉田みや、坂本大樹、猪飼航一郎、川上隆史、Site-specific Labeling of Peptide-tagged Proteins with Nano-sized Fluorescent Probes in Living Cells for Single-molecule Imaging、日本ペプチド学会第53回ペプチド討論会、2016年
  - ⑫ 川上隆史、試験管内分子進化法を用いた PPI 阻害環状 N アルキルペプチド化合物の創製、新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー」地区ミニシンポジウム～天然物ケミカルバイオロジーの更なる発展を目指して～（招待講演）、2016年
  - ⑬ Takashi Kawakami, Naoki Goshima, and Tohru Natsume, Directed evolution of antibody-like peptides for proteomics, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015
  - ⑭ 川上隆史、伊藤進也、五島直樹、永田和宏、夏目徹、無細胞分子進化法と超高感度質量分析を用いた翻訳後修飾の網羅的解析、日本ペプチド学会第52回ペプチド討論会、2015年
  - ⑮ 川上隆史、村上一馬、坂本大樹、花木瑞穂、夏目徹、入江一浩、アミロイドβ二量体を標的とする非天然型環状ペプチドの試験管内分子進化、日本ペプチド学会第52回ペプチド討論会、2015年
  - ⑯ 川上隆史、進化分子工学と有機合成化学を基盤とするペプチドツール創製システムの構築、BioJapan2015 World Business Forum（招待講演）、2015年
  - ⑰ 川上隆史、五島直樹、夏目徹、タンパク質ラベリング用ペプチドタグの進化分子工学的創製システムの構築、日本ケミカルバイオロジー学会第10回年会、2015年
  - ⑱ 川上隆史、五島直樹、夏目徹、プロテオミクスアプローチによるタンパク質間相互作用阻害剤の同定、「天然物ケミカルバイオロジー～分子標的と活性制御～」第8回公開シンポジウム、2015年

〔図書〕（計2件）

- ① 山本美月、川上隆史、羊土社、2種類の人工塩基を有する DNA アプタマー、2018、62-63
- ② 山本美月、鈴木宏輝、岩渕智宏、清水優、川上隆史、技術情報協会、細胞膜透過性ペプチド創製を指向した PURE システムと mRNA ディスプレイ法による大環状 N アルキルペプチドの超高速スクリーニング、2017、332-342

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：任意の標的物質と共有結合可能な（ポリ）ペプチド／タンパク質タグの選択方法及び選択されて得られた（ポリ）ペプチド／タンパク質タグ

発明者：川上隆史、夏目徹

権利者：国立研究開発法人産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特願 2015-160191

出願年月日：平成27年8月14日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.bt.yamanashi.ac.jp/modules/kenkyu/index.php?content\\_id=20](http://www.bt.yamanashi.ac.jp/modules/kenkyu/index.php?content_id=20)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。